

VERIFIKASI PENGUJIAN ELISA ANTIBODI JEMBRANA DISEASE (JD)

*Arif Supriyadi dan *Dian Karyanti

* Balai Veteriner Banjarbaru
abuqoyyah@yahoo.co.id

ABSTRAK

Telah dilakukan verifikasi pengujian ELISA antibodi Jembrana Disease (JD) di Balai Veteriner Banjarbaru pada bulan Januari tahun 2019. Tujuan pengujian adalah untuk mengetahui stabilitas bahan dan presisi pengujian ELISA antibodi JD dengan menggunakan antigen, serum kontrol positif dan negatif produksi BBVet Denpasar. Manfaat penelitian adalah untuk memberikan informasi bagi perbaikan kualitas dan distribusi bahan pengujian ELISA antibodi JD produksi BBVet Denpasar. Materi pengujian adalah serum kontrol positif, negatif dan 885 serum sapi Bali yang berasal dari beberapa Kabupaten di Kalimantan dari sapi Bali yang divaksinasi dan tidak divaksinasi JD. Pengujian dilakukan 10 kali pengulangan dalam 5 waktu yang berbeda. Metode pengujian sesuai dengan metode standar pengujian ELISA antibodi JD dari BBVet Denpasar. Analisa data dilakukan dengan statistik deskriptif untuk mengetahui stabilitas bahan pengujian dan presisi pengujiannya. Stabilitas bahan pengujian ELISA JD dilakukan dengan menghitung standar deviasi baku kontrol positif pada pengenceran 100 kali yaitu 0,255 dan kontrol negatif pada pengenceran 100 kali yaitu 0,139. Penghitungan presisi pengujian dilakukan dengan menghitung koefisien variasi kontrol positif pada pengenceran 100 kali yaitu 18,35% dan kontrol negatif pada pengenceran 100 kali yaitu 23,89%. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahan pengujian masih stabil karena nilai standar deviasi baku masih kurang dari 0,3 sedangkan presisi pengujian masih rendah karena nilai koefisien variasi lebih dari 10%. Untuk mempertahankan stabilitas bahan pengujian ELISA JD, maka pengiriman perlu dilakukan dengan ekspedisi tercepat dan dipacking secara aman dilengkapi dengan ice pack yang cukup sehingga bahan tidak rusak. Pengujian kontrol positif dan negatif perlu dilakukan duplo untuk lebih mengetahui keseragaman nilai hasil uji. Untuk mendapatkan presisi yang tinggi penambahan stopper perlu dilakukan pada waktu yang sama.

Kata kunci: ELISA antibodi JD, stabilitas, presisi

PENDAHULUAN

Jembrana Diseases (JD) merupakan penyakit hewan menular strategis prioritas utama khususnya di Pulau Kalimantan dan Sumatera. Seluruh propinsi di Kalimantan telah tertular JD dengan kejadian bersifat sporadis. Pada umumnya letupan kasus terjadi di daerah endemis atau daerah yang baru mendatangkan ternak reaktor JD dari daerah lain. Selama periode 5 tahun terakhir, trend kasus JD di Kalimantan mengalami peningkatan dengan prevalensi 2,51 % (Supriyadi, 2019).

Balai Veteriner Banjarbaru melakukan surveilan JD secara rutin dengan menggunakan metode *risk base* surveilan yang bertujuan untuk mengetahui status untuk pengendalian penyakit. Pengujian diagnosa laboratorium dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mendeteksi virus dan *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk mendeteksi antibodi virus Jembrana.

Uji ELISA memiliki kelebihan berupa kemudahan dalam pengerjaan cepat, dapat digunakan untuk banyak sampel dan mempunyai sensitifitas yang

tinggi. Pengujian ELISA antibodi JD BBVet Denpasar menggunakan antigen rekombinan J gag 6 H mempunyai sensitifitas sd 100% (Lewis, *et. al.*, 2009), sehingga uji tersebut sangat baik sebagai uji skrining terhadap infeksi atau untuk memonitor antibodi vaksinasi. Infeksi virus JD bersifat immunosupresif sehingga titer antibodi JD baru muncul dalam waktu 8 minggu (Hartaningsih, *et. al.*, 1994). Sapi bali yang sembuh dari infeksi JD akan mempunyai antibodi yang bertahan dalam tubuh selama 25 bulan minggu dan melindungi dari infeksi ulangan (Soeharsono, *et. al.*, 1990).

Pengujian ELISA antibodi JD pertama kali dilakukan oleh Balai Besar Veteriner Denpasar dengan menggunakan kit produksi buatan sendiri. Balai Veteriner Banjarbaru mengirimkan sampel pengujian ELISA JD ke BBVet Denpasar. Setelah kit ELISA diproduksi oleh PUSVETMA, BVet Banjarbaru melakukan pengujian sendiri dengan menggunakan kit dari PUSVETMA. Karena ketidakadaan kit dari PUSVETMA, BVet Banjarbaru melakukan pengujian JD dengan menggunakan kit/antigen dari BBVet Denpasar.

Balai Veteriner Banjarbaru tidak mempunyai ketersediaan bahan pengujian ELISA antibodi JD untuk pengujian surveilan. Oleh karena itu pada tanggal 21 Desember 2018 meminta kepada BBVet Denpasar memenuhi permintaan dan kemudian dikirim antigen, serum kontrol positif dan negatif pada tanggal 5 Januari 2019. Pengujian ELISA dilakukan di BVet Banjarbaru sesuai dengan metode standar dari BBVet Denpasar.

TUJUAN

Tujuan verifikasi pengujian ELISA antibodi JD adalah untuk mengetahui stabilitas bahan pengujian (antigen, kontrol serum positif dan negatif) dan presisi pengujian dengan menggunakan kit produksi BBVet Denpasar. Manfaat kegiatan adalah memberikan informasi untuk perbaikan kualitas produksi dan distribusi bahan pengujian ELISA antibodi JD produksi BBVet Denpasar.

MATERI DAN METODE

Materi pengujian adalah 885 serum sapi Bali sebanyak yang berasal dari beberapa Kabupaten di Kalimantan baik dari sapi Bali yang divaksinasi dan tidak divaksinasi JD. Pengujian dilakukan dalam 5 waktu yang berbeda, dengan masing-masing pengujian 2 plate. Uji ELISA antibodi JD adalah sesuai dengan manual diagnosa ELISA JD (Hartaningsih, 2002). Antigen *J Gag 6 His* dilarutkan dengan *carbonat coating buffer* 1:50 kemudian diisikan ke dalam seluruh sumuran *mikroplate* kecuali A1 dan B1 yang hanya diisi *coating buffer* dihomogenkan dengan shaker dan diinkubasikan pada suhu 4°C selama 24 jam. *Mikroplate* dicuci dengan PBST 3 kali dan diisi dengan 50 ul 5% skim milk dan diinkubasikan selama 1 jam. Serum kontrol positif diencerkan 1: 100, 1:200, dan 1:400 dengan skim milk 5% dan dimasukkan ke dalam sumuran C1, D1 dan

E1 0,5 ul. Serum kontrol negatif diencerkan 1:100 dan 1:200 dan dimasukkan ke dalam sumuran F1 dan G1 0,5 ul. Serum yang akan diuji diencerkan 1:100 dan dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran. *Mikroplate* dihomogenkan dengan shaker dan diinkubasikan 37 C selama 1 jam kemudian dicuci dengan PBS T 3 kali. Konjugat *antibovine Ig G whole molecule* (SIGMA) diencerkan 1:2000 dan dimasukkan ke dalam semua sumuran 50 ul diinkubasikan pada suhu 37 C selama 1 jam kemudian dicuci 3 kali dengan PBS T. Substrat kromogen yang terdiri dari Hidrogen Peroksida H_2O_2 1 bagian dan 9 bagian 2.2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline - 6 sulfonic acid diamonium sulfat) dimasukan ke dalam semua sumuran 50 ul dihomogenkan dengan shaker dan diinkubasikan selama 2 - 5 menit sampai terlihat biru. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 ul asam oksalat ke semua sumuran. Hasil dibaca dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm. Sampel dinyatakan positif antibodi JD jika nilai OD sampel lebih besar atau sama dengan OD sampel kontrol positif pengenceran 1:100, dan negatif jika nilai OD sampel kurang dari OD sampel kontrol positif pengenceran 1:100. Analisa data dilakukan dengan statistik deskriptif untuk mengetahui stabilitas bahan pengujian dan presisi pengujiannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian ELISA dilakukan terhadap 885 sampel yang dikerjakan dalam 10 plate seperti dalam lampiran. Interpretasi pengujian dilakukan dengan membandingkan hasil pembacaan ELISA reader sampel serum dan sampel kontrol. Hasil dinyatakan positif jika nilai sampel lebih dari atau sama dengan nilai sampel kontrol positif pada pengenceran 100 kali. Hasil pengujian diperoleh 181 (20,45%) positif antibodi dan 534 (79,55%) negatif antibodi.

Evaluasi stabilitas bahan pengujian ELISA JD dilakukan dengan menghitung standar deviasi baku kontrol positif pada pengenceran 100 kali yaitu 0,255 dan kontrol negatif pada pengenceran 100 kali yaitu 0,139. Pengujian dilakukan dengan 10 kali ulangan. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahan pengujian (kontrol positif dan negatif) masih stabil karena nilai standar deviasi kurang dari 0,3 standar deviasi.

Penghitungan presisi pengujian dilakukan dengan menghitung koefisien variasi kontrol positif pada pengenceran 100 kali yaitu 18,35%% dan kontrol negatif pada pengenceran 100 kali yaitu 23,89%. Pengujian dilakukan dengan 10 kali ulangan Hasil yang diperoleh menunjukkan presisi pengujian ELISA JD masih rendah karena lebih dari 10 %. Analisa statistik seperti tercantum dalam tabel berikut.

Tabel Analisa data perhitungan stabilitas dan homogenitas pengujian ELISA JD

Ulangan pengujian	Kontrol + pengenceran 100X	Statistik	Kontrol - pengenceran 100X	Statistik
1	1,081	Mean : 1,3926	0,462	Mean : 0,5816
2	1,081	SD : 0,255611	0,466	SD : 0,138946
3	1,081	CV : 0,18355	0,365	CV : 0,238903
4	1,47		0,466	
5	1,509		0,609	
6	1,282		0,596	
7	1,445		0,711	
8	1,837		0,635	
9	1,6		0,81	
10	1,54		0,696	

Dilihat dari potensi titik kritis yang menentukan kualitas adalah stabilitas bahan pengujian. Hasil pengujian yang dilakukan menunjukkan bahwa bahan pengujian masih stabil, kontrol positif dan negatif masih standar. Padahal terjadi permasalahan dalam pengiriman disebabkan karena pengiriman bahan pengujian (antigen dan serum kontrol) dalam 5 hari. Hal tersebut menyebabkan terjadinya pemanasan suhu pada box yang dapat merusak kualitas bahan. Karena antigen dan antiserum merupakan protein yang tidak tahan panas dan perlu pengawet dengan pendingin. Bahan uji diterima dalam keadaan tidak dingin dan *ice pack* sudah meleleh. Serum kontrol berwarna agak kehijauan dan agak mengental. Lamanya proses pengiriman disebabkan karena ekspedisi libur tahun baru.

Nilai presisi yang diperoleh masih rendah kemungkinan disebabkan karena tidak seragamnya waktu untuk penambahan stoper sehingga menghasilkan nilai OD yang sangat bervariasi antar plate pengujian satu dengan yang lainnya. Penentuan penghentian reaksi perkembangan warna dilakukan berdasarkan dengan pemantauan nilai OD, jika mencapai 0,9 dilakukan penghentian. Padahal agak sulit untuk memantau hasil reaksi untuk mencapai nilai 0,9. Sehingga pada saat penghentian reaksi nilainya tidak lagi 0,9 akibatnya nilai akhir pembacaan mempunyai variasi yang besar. Penghentian reaksi yang dilakukan 2 -5 menit sesuai dengan rekomendasi ternyata belum menghasilkan nilai yang diharapkan. Untuk mendapatkan nilai OD 0,9 diperlukan waktu 15 menit.

KESIMPULAN DAN SARAN

Bahan pengujian (antigen dan serum kontrol) ELISA JD yang diproduksi dan dikirimkan oleh BBVet Denpasar masih mempunyai kualitas yang baik (stabil) dan dapat dipakai untuk pengujian akan tetapi nilai presisinya masih kurang.

Pengiriman bahan pengujian perlu dilakukan dengan ekspedisi tercepat dan dipacking secara aman dilengkapi dengan ice pack yang cukup sehingga bahan tidak rusak. Pengujian kontrol positif dan negatif perlu dilakukan duplo untuk lebih mengetahui keseragaman nilai hasil uji. Untuk mendapatkan presisi yang tinggi penambahan stopper perlu dilakukan pada waktu yang sama.

KETERBATASAN

Penelitian hanya dilakukan terhadap hasil akhir pengujian dan tidak dilakukan terhadap tiap tahapan pengujian seperti titrasi antigen, konjugate. Jumlah sampel standar hanya ada 2 yaitu kontrol positif dan negatif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih Disampaikan kepada BBVet Denpasar yang telah menyediakan dan mengirimkan kit dan memberikan bimbingan teknis pengujian Kepada BVet Banjarbaru

DAFTAR PUSTAKA

- Hartaningsih, N. 2002. Manual Diagnosa Laboratorik Penyakit Jembrana. Denpasar (ID). BPPV-VI
- Hartaningsih, N., Wilcox, G.E., Kertayadnya, G., Astawa, M., 1994. Antibody response to Jembrana disease virus in Bali cattle. *Vet. Microbiol.* 39: 15-23.
- Lewis, J. R., McNab, T., Tenaya, M., Hartaningsih, N., Wilcox, G. E. and Desport, M. Comparison of immunoassay and real-time PCR methods for the detection of Jembrana disease virus infection in Bali cattle. *J. of Vir. Methods* 159: 81-86.
- Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Soetrisno, M., Kertayadnya, G. and Wilcox, G.E. 1990. Studies of experimental Jembrana disease in Bali cattle. I. Transmission and persistence of the infectious agent in ruminants and pigs, and resistance of recovered cattle to re-infection. *J. Comp. Pathol.* 103: 49-59.
- Supriyadi, A. 2019. Surveilans Penyakit Viral Jembrana Disease (JD). Banjarbaru (ID). BVet Banjarbaru